

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIO CÉSAR DE ARAÚJO AMATUZI

EFEITO DE EXTRATOS DE ALGAS MARINHAS NA MORFOGÊNESE *IN*  
*VITRO* DE *Epidendrum secundum* Jacq.

CURITIBA

2018

JULIO CÉSAR DE ARAÚJO AMATUZI

EFEITO DE EXTRATOS DE ALGAS MARINHAS NA MORFOGÊNESE *IN*  
*VITRO* DE *Epidendrum secundum* Jacq.

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre, no Curso de  
Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Hugo Pacheco de Freitas Fraga  
Co-orientadora: Leila do Nascimento Vieira

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940)

Amatuzi, Julio César de Araújo

Efeito de extratos de algas marinhas na morfogênese *in vitro* de  
*Epidendrum secundum* Jacq. / Julio César de Araújo Amatuzi. – Curitiba,  
2018.

53 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Hugo Pacheco de Freitas Fraga.

Coorientadora: Leila do Nascimento Vieira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Orquidea. 2. Alga marinha. I. Título. II. Fraga, Hugo Pacheco de  
Freitas. III. Vieira, Leila do Nascimento. IV. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (20. ed.) 584.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**Efeito de extratos de algas marinhas na morfogênese *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq.**

por

**Julio César de Araújo Amatuzy**

**Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos doutores**

Hugo Pacheco de Freitas Fraga

Miguel Daniel Nosedá

Giovana Bomfim de Alcantara

Curitiba, 27 de agosto de 2018.

Um Sol cuja luz teve que se extinguir da Terra para poder brilhar mais intensamente no céu. Para Solange de Araújo Matias (*in memoriam*), amada tia e amiga, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço ao Universo, cujos caminhos preparados para mim, embora algumas vezes de difícil compreensão, têm me guiado gentil e sabiamente a cada passo dado.

Agradeço à minha família por seu apoio incondicional, em especial minha mãe por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando eu próprio não era capaz de fazê-lo. Aos meus amigos, e todos os colegas do laboratório, com os quais pude dividir momentos que, certamente, levarei para sempre comigo na memória.

Gostaria de agradecer a todo o corpo docente da UFPR, cujos ensinamentos contribuíram com minha formação acadêmica, profissional e pessoal, permitindo que eu chegasse até aqui. Agradeço especialmente aos meus orientadores, prof. Hugo e prof.<sup>a</sup> Leila, pelo voto de confiança, pelo esforço sem medidas, e por todo o apoio dado nos momentos em que a conclusão deste trabalho se tornou um peso maior do que eu podia suportar. Minha eterna gratidão.

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná pela confiança, e a CAPES e CNPq pelos subsídios necessários para a realização deste mestrado e plena execução das atividades.

A todos que direta ou indiretamente participaram ou colaboraram comigo nestes dois anos, o meu muito obrigado.

“Todas as coisas destinadas a serem suas,  
encontrarão o caminho  
para chegar até você”.



## RESUMO

Orquídeas compreendem uma das maiores famílias de angiospermas e são espécies de alto interesse econômico e ecológico. Muitas dessas espécies encontram-se sob ameaça de extinção por conta do extrativismo e fragmentação das suas áreas de ocorrência natural. Em geral, as sementes de orquídeas apresentam baixas taxas de germinação na natureza devido à escassez de reservas nutritivas na semente e necessidade de interação com fungos micorrízicos. A propagação *in vitro* é uma alternativa para otimizar o processo germinativo e a posterior formação de plântulas. Assim, o presente trabalho buscou otimizar as condições de cultivo *in vitro* de plântulas da orquídea *Epidendrum secundum* através da suplementação com diferentes concentrações de extrato aquoso das algas marinhas *Kappaphycus alvarezii* e *Ulva fasciata*. Sementes de *E. secundum* foram germinadas *in vitro* e as plântulas obtidas foram inoculadas em meio de cultura MS/2 suplementado com sacarose 30 g L<sup>-1</sup> e diferentes concentrações dos extratos de algas: 0, 6, 12, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>. Após 90 dias de cultivo foram realizadas análises morfoanatômicas e quantificação de poliaminas (PAs) livres nas plântulas, além verificar as taxas de sobrevivência durante a aclimatização. Além disso, foi realizada a caracterização bioquímica do extrato de *K. alvarezii* através de ressonância magnética nuclear (RMN). Enquanto o extrato de *U. fasciata* parece ter exercido um efeito inibitório sobre o desenvolvimento das plântulas de *E. secundum*, a presença do extrato de *K. alvarezii* estimulou seu desenvolvimento de forma proporcional ao aumento da concentração, exceto em 100 mg L<sup>-1</sup>, que demonstrou efeito deletério. O tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> apresentou os melhores resultados, favorecendo o aumento das plântulas, comprimento das folhas e raízes, ganho de massa fresca e número de brotos formados. A anatomia dos ápices radiculares nos tratamentos 0 e 50 mg L<sup>-1</sup> de extrato indicou características anatômicas bastante semelhantes. O tratamento 100 mg L<sup>-1</sup> indicou alterações no grau de diferenciação celular, mostrando células com hipertrofia e menos diferenciadas. Embora a lâmina foliar dos tratamentos 0 e 100 mg L<sup>-1</sup> apresentasse epiderme bem organizada, o mesofilo mostrou células do parênquima grandes e mal organizadas, sem feixes de fibras. Em contraste, o tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> mostrou mesofilo mais compacto com células bem organizadas e diversos feixes de fibras. A quantificação de PAs livres indicou a presença de espermidina e uma diminuição da putrescina conforme o aumento na concentração do extrato. Na aclimatização, observou-se maior taxa de sobrevivência entre as plântulas que foram propagadas na presença do extrato de *K. alvarezii*. A análise de RMN indicou no extrato a presença dos glicosídeos digeneasídeo e floridosídeo, descritos como osmorreguladores. O uso do extrato de *K. alvarezii* indica potencial aplicação como um composto bioativo no cultivo *in vitro* de *E. secundum* devido ao seu efeito bioestimulante na morfogênese e podendo, assim, acelerar o desenvolvimento dessa e outras espécies ameaçadas de extinção para sua posterior reintrodução na natureza.

**PALAVRAS-CHAVES:** micropropagação, cultura de tecidos, orquídeas, atividade bioestimulante, macroalgas.



## ABSTRACT

Orchidaceae is one of the largest families of angiosperms and are species of high economic and ecological interest. Many of these species are under threat of extinction due to the extractivism and fragmentation of their naturally occurring areas. In general, orchid seeds have low germination rates in nature due to the scarcity of nutrient reserves in the seed and the need of interaction with mycorrhizal fungi. *In vitro* propagation is an alternative to optimize the germination process and the subsequent plantlet development. Thus, the present study aimed to optimize the *in vitro* culture conditions of *Epidendrum secundum* plantlets through supplementation with different concentrations of aqueous extract of the seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva fasciata*. Seeds of *E. secundum* were *in vitro* germinated and the plantlets obtained were inoculated in MS/2 culture medium supplemented with sucrose 30 g L<sup>-1</sup> and different concentrations of seaweed extracts: 0, 6, 12, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>. After 90 days of culture, morphohistological analysis and quantification of free polyamines (PAs) in the plantlets were performed, besides evaluating the survival rates during acclimatization. In addition, the biochemical characterization of the extract through nuclear magnetic resonance (NMR) was performed. While the extract of *U. fasciata* indicated an inhibitory effect on the development of *E. secundum* plantlets, the supplementation of *K. alvarezii* extract stimulated its development proportionally to the increasing the concentration, except in 100 mg L<sup>-1</sup> treatment, which showed deleterious effects. The treatment with 50 mg L<sup>-1</sup> showed the best results, favoring plantlet growth, increased leaf and root length, fresh weight gain and number of buds formed. The anatomy of root apices in 0 and 50 mg L<sup>-1</sup> treatments indicated very similar anatomical characteristics. The 100 mg L<sup>-1</sup> treatment indicated changes in the degree of cell differentiation, showing cells with hypertrophy and less differentiated. Although the foliar leaf of treatments 0 and 100 mg L<sup>-1</sup> presented organized epidermis, the mesophyll showed large and poorly organized parenchyma, without fiber bundles. In contrast, treatment with 50 mg L<sup>-1</sup> showed a more compact mesophyll with well organized cells and several fiber bundles. Free PAs quantification indicated the presence of spermidine and a decrease of putrescine as the concentration of the extract increased. In acclimatization, a higher survival rate was observed among the plantlets that were propagated in the presence of *K. alvarezii* extract. NMR analysis indicated the presence of glycosides with osmoregulatory function in the *K. alvarezii* extract. The use of *K. alvarezii* extract indicates potential application as a bioactive compound in the *in vitro* culture of *E. secundum* due to its biostimulating effect on morphogenesis and can thus accelerate the development of this and other endangered species for later reintroduction into nature.

**KEYWORDS:** micropropagation, tissue culture, orchids, biostimulant activity, macroalgae.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Murashige & Skoog (1962);
MS/2	Murashige & Skoog (1962), com metade da concentração de sais;
NaOH	Hidróxido de sódio
PA	Poliamina
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WPM	“Woody Plant Medium” (MCCown & Lloyd, 1980)
Nu	Núcleo
Nc	Nucléolo
Va	Vacúolos
Ra	Ráfide
Pc	Procâmbio
Xi	Xilema
SAM	S-adenosilmetionina
ESP	Estruturas semelhantes a protocormos
RMN	Ressonância magnética nuclear
ns	Não significativo
Put	Putrescina
Spd	Espermidina
Spm	Espermina

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**FIGURA 1.** *Epidendrum secundum*.

**FIGURA 2.** Características morfológicas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS / 2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Ulva fasciata*.

**FIGURA 3.** Comprimento (mm) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*.

**FIGURA 4.** Comprimento (mm) das raízes de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*.

**FIGURA 5.** Comprimento (mm) das folhas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*.

**FIGURA 6.** Massa fresca (g) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*.

**FIGURA 7.** Características morfológicas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS / 2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 8.** Massa fresca (g) analisada de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 9.** Comprimento das plântulas analisadas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 10.** Comprimento da maior raiz (mm) analisadas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 11.** Comprimento da maior folha analisadas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 12.** Número de brotos e folhas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 13.** Anatomia da raiz de *Epidendrum secundum* (cortes longitudinais em microscopia de luz).

**FIGURA 14.** Anatomia foliar de *Epidendrum secundum* (cortes longitudinais em microscopia de luz).

**FIGURA 15.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do extrato aquoso obtido da alga marinha vermelha *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 16.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do extrato aquoso obtido da alga marinha vermelha *Kappaphycus alvarezii*.

**FIGURA 17.** Teores endógenos de putrescina (a) e espermidina (b) de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*.

**TABELA 1.** Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Epidendrum secundum* provenientes de diferentes tratamentos, durante aclimatização.

**TABELA 2.** Porcentagem de explantes que responderam aos tratamentos e número de novos brotos de *Epidendrum secundum*, a partir de bases foliares.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE .....	17
2.1.1 <i>Epidendrum secundum</i> .....	17
2.2 DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS, TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO .....	19
2.3 EXTRATOS VEGETAIS BIOESTIMULANTES .....	19
2.3.1 <i>Ulva fasciata</i> Delile .....	20
2.3.2 <i>Kappaphycus alvarezii</i> Doty (Doty) ex P.C. Silva .....	20
2.4 POLIAMINAS .....	21
<b>3 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>23</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1. MATERIAL VEGETAL .....	24
4.2 EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NO ALONGAMENTO DE PLÂNTULAS.....	24
4.2.1 Preparo dos extratos .....	24
4.2.2 Alongamento e desenvolvimento de plântulas .....	25
4.3 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS.....	26
4.4 MICROSCOPIA ÓPTICA .....	26
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS .....	26
4.6 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
5.1 EFEITO DO EXTRATO <i>Ulva fasciata</i> NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS.....	29
5.2 EFEITO DO EXTRATO <i>Kappaphycus alvarezii</i> NO DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS .....	33
5.3 EFEITOS DO EXTRATO DE <i>K. alvarezii</i> NA ANATOMIA DE RAÍZES E FOLHAS .....	39
5.4 ESPECTROSCOPIA DE RMN DO EXTRATO DE <i>K. alvarezii</i> .....	42
5.5 SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS À ACLIMATIZAÇÃO .....	44
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS .....	45
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas (THE PLANT LIST, 2013) e inclui espécies com alta importância econômica, ecológica e medicinal (DRESSLER, 2005; LO *et al.*, 2004). O Brasil possui uma alta diversidade de espécies de Orchidaceae. Entre eles, o gênero nativo brasileiro *Epidendrum* L. ocorre na Mata Atlântica brasileira, que é um *hotspot* de biodiversidade, mas, infelizmente, é altamente ameaçado e fragmentado (RIBEIRO *et al.*, 2009). A Lista Brasileira de Espécies de Plantas Ameaçadas inclui 167 espécies de orquídeas, cinco delas do gênero *Epidendrum* (BRASIL, 2014).

Pinheiro e Barros (2007) descrevem o gênero *Epidendrum* como um dos mais importantes dentro da família, com um grande número de espécies neotropicais, amplamente distribuídas na América do Sul. O *Epidendrum secundum* é considerado uma espécie com grande potencial ecológico e econômico (MASSARO *et al.*, 2012). Esta espécie é caracterizada por organismos epífitas, terrestres ou rupícolas, com flores variando de lilás a rosa (STANCIK *et al.*, 2009). No entanto, seu estado atual de conservação requer o desenvolvimento de abordagens integradas de conservação, como a implementação de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* (SWARTS, DIXON, 2009).

Embora orquídeas produzam uma grande quantidade de sementes, estas apresentam baixa porcentagem de germinação na natureza. Suas sementes são muito pequenas e, em geral, desprovidas de endosperma, além de necessitarem de interações com fungos micorrízicos para sua germinação (ARDITTI, GHANI, 2000). Esta relação simbiótica entre orquídeas e fungos é importante tanto para a germinação das sementes como para o desenvolvimento posterior das plântulas (JOHANSEN, RASMUSSEN, 1992).

Para melhorar a germinação e o desenvolvimento de orquídeas, técnicas *in vitro* têm sido aplicadas com sucesso. As sementes de orquídea podem ser germinadas assepticamente com sucesso em meio de cultura. A composição do meio de cultura deve abordar os requisitos metabólicos e fisiológicos da espécie, fornecendo água, nutrientes essenciais e reguladores vegetais, que determinarão como as plantas irão se desenvolver (CHUGH *et al.*, 2009).



Várias formulações foram testadas e otimizadas para o estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas, variando a composição de sais e fontes de nutrientes (por exemplo, açúcar, aminoácidos). Em alguns casos, a suplementação do meio de cultura com extratos vegetais foi utilizada como bioestimulantes, com diferentes aplicações como: enraizamento de estacas, germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* (GOEL *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012).

Os extratos de algas são utilizados na agricultura como bioestimulantes e, entre eles, 29,8% são de algas vermelhas (Rhodophyta), principalmente do gênero *Gracilaria* Grev., *Hypnea* J.V.Lamour. e *Kappaphycus* Doty, e cerca de 36,2% são algas verdes, principalmente aquelas do gênero *Ulva* L. (DAPPER *et al.*, 2014). Rathore *et al.* (2009) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *K. alvarezii* na produtividade de grãos em soja e, após aplicações foliares, observaram aumento de 57% no rendimento de grãos em plantas tratadas com o extrato. A pulverização do extrato de *U. fasciata* tem sido descrita como eficiente na promoção da germinação e do crescimento vegetal de *Lupinus albus* (HAMOUDA, 2012).

Nesse contexto, investir em pesquisas que busquem otimizar as condições de cultivo *in vitro* e a elaboração de novos protocolos é essencial. Esses estudos podem garantir uma melhor eficiência da técnica e, assim, acelerar o desenvolvimento de espécies ameaçadas de extinção para sua posterior reintrodução na natureza. O uso de substâncias bioestimulantes no meio de cultura pode se tornar uma ferramenta interessante no campo da pesquisa em micropropagação, uma vez que é uma alternativa natural ao uso de reguladores vegetais e outros aditivos, que muitas vezes oneram a técnica.

Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi otimizar as condições de cultivo *in vitro* de plântulas de *Epidendrum secundum* através da suplementação com diferentes concentrações de extrato aquoso das algas marinhas *Kappaphycus alvarezii* e *Ulva fasciata*, verificando seus efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento como também as taxas de sobrevivência durante a aclimatização.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias de plantas com flores, englobando cerca de 24 mil espécies, com aproximadamente 1.800 gêneros. Essas espécies encontram-se amplamente distribuídas, porém com maior diversidade nas montanhas tropicais (DRESSLER, 2005).

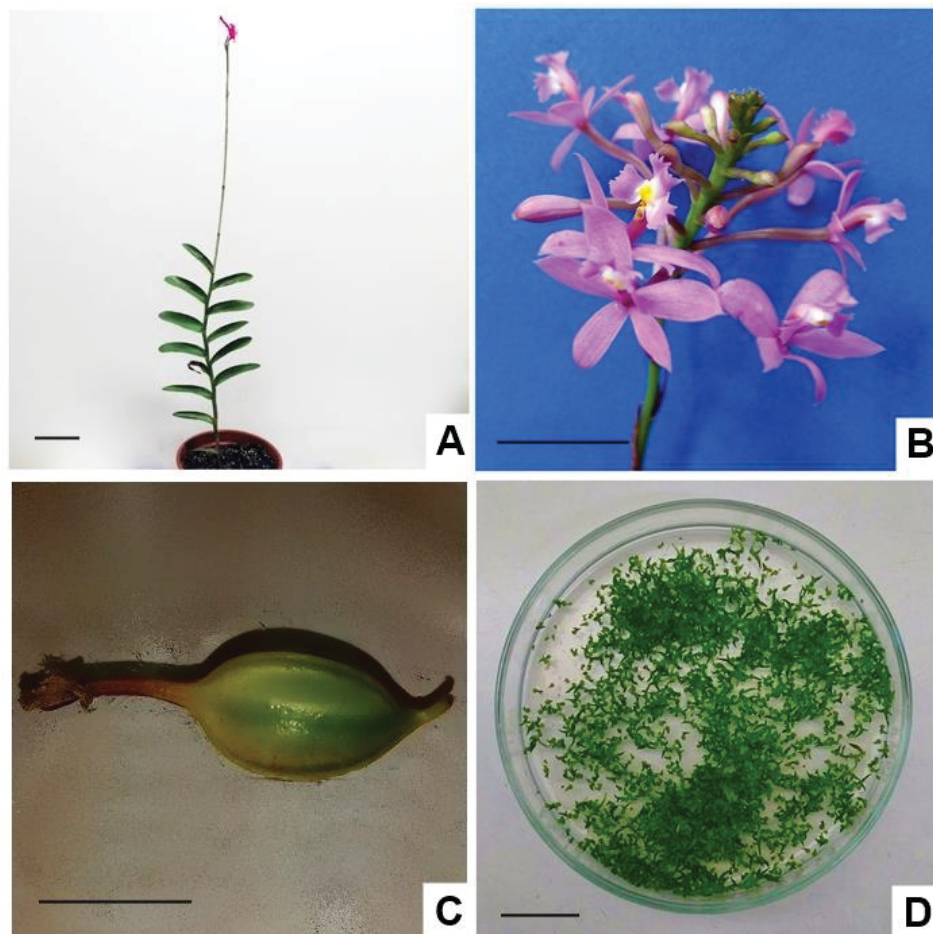
Muitas espécies estão restritas, no Brasil, a um dos biomas mais ameaçados do planeta, a Mata Atlântica, considerada um dos *hotspots* de biodiversidade do planeta (MYERS *et al.*, 2000). Muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo de seus habitats naturais pelo extrativismo e destruição do ecossistema onde estão inseridas, correndo risco de extinção, além de causar a evasão dos polinizadores dificultando sua propagação e reprodução (CHUGH *et al.* 2009).

#### 2.1.1 *Epidendrum secundum*

A tribo neotropical Epidendreae pertence à subfamília Epidendroideae, que é a maior dentre as cinco subfamílias de Orchidaceae, compreendendo mais de 500 gêneros (DRESSLER, 1993). Epidendreae divide-se em seis subtribos, sendo: Bletiinae, Chysinae, Coeliinae, Laeliinae, Pleurothallidinae e Poneriinae compreende cerca de 120 gêneros, apresentando mais de 6.000 espécies (DRESSLER, 2005).

Pinheiro e Barros (2007) descrevem o gênero *Epidendrum* como um dos mais importantes dentro da família, possuindo grande número de espécies com características neotropicais, amplamente distribuídas na América do Sul. O gênero, porém, sofre com o extrativismo por conta do crescente interesse comercial. Uma espécie que se destaca dentro do gênero é *Epidendrum secundum* Jacq., sendo considerada de grande importância, movimentando o comércio florístico, além da produção de híbridos (MASSARO *et al.*, 2012). A espécie caracteriza-se por indivíduos de hábitos epífitas, terrícolas ou rupículas, com flores que variam entre lilás e rosa (conforme exibido na FIGURA 1A e 1B,

a seguir), as quais florescem durante todo o ano (STANCIK; GOLDENBERG; BARROS, 2009).



**FIGURA 2.** *Epidendrum secundum*. A: indivíduo adulto (Barra = 5 cm); B: aspecto geral das flores; C: cápsula madura fechada; D: plântulas com 16 semanas, germinadas em meio MS/2. (Barra = 2 cm).

A propagação *in vitro* de *E. secundum* tem sido descrita na literatura. Massaro *et al.* (2012) avaliaram a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *E. secundum* em meios simplificados, tendo melhores resultados em MS/2, enquanto Ferreira, Smidt e Ribas (2015) realizaram a germinação em meio WPM. No entanto, estudos voltados à utilização de extratos de algas para o desenvolvimento *in vitro* dessa espécie ainda não foram relatados.

## 2.2 DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS, TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

O processo de aclimatização de plântulas é um dos estágios mais delicados de um protocolo de micropropagação de plantas. O transplântio envolve a retirada das plântulas do ambiente *in vitro* e sua transferência para casa de vegetação (condição *ex vitro*), onde temperatura, umidade, luminosidade e substrato são controlados (COSTA, 1998). Neste processo as plantas estão sujeitas a desidratação excessiva e consequente morte, visto que *in vitro* elas se encontram em condições de altíssima umidade relativa (KUMAR e RAO, 2012). Sendo assim, estudos devem ser feitos visando reduzir as perdas nesta etapa.

Colombo *et al.* (2005), utilizaram pó de coco, fibra de coco, xaxim desfibrado e esfagno como substrato na aclimatização de mudas de um híbrido de *Cattleya*, observando que pó de coco foi melhor indicado para tal finalidade, proporcionando taxa de 98% de sobrevivência.

## 2.3 EXTRATOS VEGETAIS BIOESTIMULANTES

Berlyn e Russo (1990) conceituaram bioestimulantes como substâncias não fertilizantes com efeito benéfico no processo de crescimento vegetal. Inúmeros estudos têm sido conduzidos relatando o efeito de diferentes substâncias sobre o desenvolvimento vegetal (YAKHIN *et al.* 2017).

O uso de extratos vegetais como bioestimulantes tem se tornado uma prática interessante, uma vez que esses, muitas vezes, possuem potencial em estimular o desenvolvimento das espécies de estudo de forma tão eficiente quanto dos próprios reguladores vegetais, com a diferença de se tratar de substâncias naturais, de fácil obtenção e muitas vezes menos onerosa.

As algas vêm sendo utilizadas na produção vegetal por ser uma fonte de nutrientes e hormônios, atuando como um bioestimulante. Santos *et al.* (2013) constataram que o extrato de algas marinhas pode possuir uma mistura de auxinas, citocininas e giberelinas. O potencial das substâncias extraídas das algas marinhas, quando aplicadas ao desenvolvimento vegetal, também foi citado por Talamini (2009), acrescentando que as algas marinhas fornecem

substâncias bioativas que aumentam a resistência das plantas, além de seu potencial como bioestimulante.

### 2.3.1 *Ulva fasciata* Delile

Das algas aplicadas à agricultura, 36,2% são algas verdes, principalmente aquelas do gênero *Ulva*, como *Ulva fasciata*, *U. lactuca*, *U. rígida*, *U. reticulata*, entre outras (DAPPER *et al.*, 2014). As algas do gênero *Ulva* estão amplamente distribuídas no litoral de diversos países, representando uma riquíssima fonte de biomassa, podendo ser empregada em diversas finalidades (JIAO *et al.*, 2011).

A alga *U. fasciata*, por exemplo, além de ser utilizada na culinária, no preparo de sopas e saladas, vem sendo foco crescente de estudos por apresentar propriedades antimicrobianas, de indução de resistência e como bioestimulante. Gestinari *et al.* (2002) observaram maior desenvolvimento da parte aérea, aumento no teor de clorofila e de massa seca em *Allium schoenoprasum*, *Petroselinum crispum* e *Raphanus sativus* ao suplementarem o substrato com pó de *Ulva* spp. na germinação das sementes dessas espécies.

A pulverização do extrato de *U. fasciata* tem sido descrita como eficiente na promoção da germinação e do crescimento vegetal de *Lupinus albus* (HAMOUDA, 2012). Esse potencial é atribuído, principalmente, a presença de ulvana, polissacarídeo sulfatado, baseado em ramnone ligada a ácido urônico (LAHAYE, 2007). Além disso, Chakraborty e Paulraj (2010) relataram atividade antioxidante dos extratos de *U. fasciata*, sendo esse potencial atribuído a presença de polifenóis e, principalmente, a uma grande variedade de compostos sesquiterpênicos.

### 2.3.2 *Kappaphycus alvarezii* Doty (Doty) ex P.C. Silva

Atribui-se a essa espécie elevado interesse econômico por conta da presença de kappa carragenana, um polissacarídeo sulfatado abundante na composição de sua parede celular. Essa substância possui grande aplicação na indústria de alimentos e bebidas como agente de geleificante, espessante, estabilizante, emulsificante, além de potencial aplicação na indústria farmacêutica e crescente interesse na agricultura (WEBBER *et al.* 2012).

Dentre as algas utilizadas na agricultura, 29,8% são algas vermelhas (Rhodophyta), principalmente aquelas do gênero *Gracilaria*, *Hypnea* e *Kappaphycus*, onde se destaca a espécie *Kappaphycus alvarezii* (DAPPER *et al.*, 2014). Rathore *et al.* (2009) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *K. alvarezii* sobre o crescimento, rendimento na produção de grãos na cultura de soja e, após aplicações foliares, observaram um aumento de 57% na produção de grãos nas plantas tratadas com extrato a 15%, quando comparado ao tratamento controle, pulverizadas com água.

## 2.4 POLIAMINAS

O termo poliamina (PA) vem sendo utilizado para se referir a pequenas moléculas alifáticas de amina, tais como putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (BOUCHEREAU *et al.*, 1999). Estas moléculas equivalem respectivamente a diamina, triamina e tetraamina, sendo que estas estão constantemente relacionadas com os processos de crescimento e desenvolvimento de plantas tais como divisão celular, embriogênese, enraizamento, florescimento e senescência (EVANS e MALMBERG, 1989). Elas também estão envolvidas na organogênese e na resposta das plantas ao estresse biótico e abiótico (WALDEN *et al.*, 1997; ALCÁZAR *et al.*, 2010).

Devido ao seu envolvimento em diversos eventos de desenvolvimento das plantas, elas foram a princípio classificadas como hormônios vegetais. Entretanto, estas não podem ser classificadas desta forma, pois a concentração de PAs necessárias para exercer um efeito fisiológico é bem maior que a concentração máxima necessária para categorizá-la como hormônio vegetal (KERBAUY, 2004; EVANS e MALMBERG, 1989). Enquanto as PAs são encontradas nas plantas em concentrações na ordem de milimolar, os hormônios são encontrados em concentrações micromolares (EVANS e MALMBERG, 1989).

As PAs podem ser encontradas nas organelas tais como cloroplastos, vacúolos e mitocôndrias, bem como associadas à parede celular (KERBAUY, 2004). Elas estão presentes tanto na forma livre como na conjugada, sendo esta última especialmente com compostos fenólicos (EVANS e MALMBERG, 1989).



Por serem polications, as poliaminas podem provocar alterações no pH celular, o que permite a ligação destas a macromoléculas poliânions tais como DNA, RNA, cromatina, proteínas, bem como a fosfolipídios componentes da parede celular (ALCÁZAR *et al.*, 2010; GALSTON e SAWHNEY, 1995). Quando as poliaminas se ligam as macromoléculas, podem ocorrer alterações na biossíntese e atividades destas macromoléculas (GALSTON e SAWHNEY, 1995), que podem resultar, por exemplo, em alterações nos eventos de transcrição e transdução, no processamento do RNA e na ativação de proteínas (WALLACE *et al.*, 2003). Já formação de complexos entre as poliaminas e os fosfolipídios podem resultar em alterações na fluidez da membrana (WALLACE *et al.*, 2003).

Tanto as formas livres como as conjugadas das poliaminas podem ser quantificadas utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). SILVEIRA *et al* (2004) propuseram um protocolo de quantificação destas moléculas que envolvem etapas de extração de poliaminas livres e conjugadas, seguida de dansilação e posterior quantificação.

### 3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho buscou otimizar as condições de cultivo *in vitro* de *Epidendrum secundum* através da adição de extratos de algas marinhas no meio de cultura de alongamento e desenvolvimento assim como avaliar seus efeitos morfoanatômicos e bioquímicos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de extratos das algas marinhas *Ulva fasciata* e *Kappaphycus alvarezii* sobre o desenvolvimento *in vitro* de *E. secundum*;
- Determinar a melhor concentração dos extratos em meio de cultura para desenvolvimento de plântulas de *E. secundum*;
- Caracterizar a composição química do melhor extrato, através de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Verificar durante a aclimatização as taxas de sobrevivência das plântulas obtidas dos diferentes tratamentos;
- Verificar possível potencial dos extratos na indução de estruturas semelhantes a protocormos (ESP's) em bases foliares de *E. secundum*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL

Foram germinadas e estabelecidas *in vitro* sementes obtidas a partir de cápsulas maduras de *E. secundum* coletadas na região serrana de São Luiz do Purunã (PR), local de ocorrência natural de indivíduos dessa espécie.

As sementes foram devidamente desinfestadas sendo mergulhadas em etanol 70% durante 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (1,5%), acrescida de 0,1% de Tween 20 durante 10 minutos, em agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada autoclavada. Após a secagem das sementes, com auxílio de uma espátula foram semeadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo 40 mL meio de cultura. As sementes foram germinadas em meio MS com a concentração de sais reduzida pela metade (MS/2) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O material foi mantido por um período de 16 semanas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C (dia) e 18 ± 2 °C (noite), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 4.2 EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NO ALONGAMENTO DE PLÂNTULAS

#### 4.2.1 Preparo dos extratos

##### 4.2.1.1 *Ulva fasciata*

O material vegetal de *U. fasciata*, coletado no litoral de Santa Catarina, foi lavado com água destilada abundante e submetido à secagem em estufa com circulação de ar durante 48 horas à temperatura de 45 °C. Em seguida, foi triturado, peneirado e reduzido a pó fino. A partir desse material foi preparado o extrato aquoso.

Para a extração, utilizou-se 5 g do material vegetal seco e triturado para 100 mL de água destilada em temperatura ambiente. Após 45 minutos mantida sob agitação constante em agitador magnético, a mistura foi filtrada em gaze,

desprezando os detritos e reservando a parte líquida, a qual foi congelada e submetida à liofilização, para eliminação total da água. Ao final, obteve-se o extrato aquoso bruto seco.

#### 4.2.1.2 *Kappaphycus alvarezii*

O extrato de *K. alvarezii* foi gentilmente cedido pela Professora Leila Hayashi, do Laboratório de Camarões Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina. As algas foram dessalinizadas superficialmente com uma solução 0,5 M de formiato de amônio e, em seguida, lavadas com água destilada para a remoção do formiato. O material foi seccionado em pequenos segmentos, congelado e liofilizado. Após a liofilização o material foi macerado em um pó fino com nitrogênio líquido e auxílio de gral e pistilo. O solvente (água destilada) foi adicionado na proporção de 100 mL para cada 10 g de pó de alga. O material foi extraído por 1h à temperatura ambiente e centrifugado. A fase líquida foi coletada e reservada e o *pellet* reextraído em água. Após a centrifugação, os sobrenadantes da primeira e segunda extração foram unidos e liofilizados, obtendo-se o extrato aquoso seco utilizado nos experimentos.

#### 4.2.2 Alongamento e desenvolvimento de plântulas

As plântulas de *E. secundum* cultivadas *in vitro* foram transferidas para o meio MS/2 suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e diferentes concentrações dos extratos de *U. fasciata* (0, 12, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>) e *K. alvarezii* (0, 6, 12, 25, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>). Na sequência, os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, antes da adição de 2,5 g L<sup>-1</sup> do agente geleificante Phytigel®. Os meios de cultura foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Foram utilizadas 12 repetições por tratamento, sendo que a unidade experimental consistiu de um frasco de capacidade de 300 mL (6,5 cm de diâmetro e 13 cm de altura) contendo seis plântulas.

As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C (dia) e 18 ± 2 °C (noite), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte

aérea, porcentagem de enraizamento, número médio e comprimento das raízes, número médio e comprimento das folhas e massa fresca das plantas.

#### 4.3 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS

Plântulas com pelo menos três folhas e três raízes foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo o substrato comercial Vitaplan® (composto de húmus de minhoca e casca de pinus). Foram utilizadas 7 plantas e duas repetições por tratamento.

As plântulas transplantadas foram aclimatizadas em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de  $13 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $24 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante o dia e  $20 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite). A irrigação foi feita manualmente, uma vez ao dia, no início da manhã. Após 30, 60 e 90 dias foi avaliada porcentagem de sobrevivência.

#### 4.4 MICROSCOPIA ÓPTICA

As análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal da Universidade Federal do Paraná, em parceria com o Prof. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos. Amostras de ápice radicular e região mediana de folhas proveniente dos tratamentos contendo 0, 50 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de extrato de *K. alvarezii* foram fixadas em paraformaldeído 2% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, lavadas em tampão fosfato e desidratadas em série etílica gradual. As amostras foram infiltradas e incluídas em hidroxietilmetacrilato (Historesina Leica®), de acordo com as instruções do fabricante. Os blocos contendo as amostras foram seccionados em  $7 \mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo e tratadas com azul de toluidina 0,05% em pH 6,8 (O' BRIEN *et al.* 1964). A visualização foi realizada em microscópio de luz e as imagens capturadas em fotomicroscópio óptico com câmera digital acoplada.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS

As análises de quantificação de poliaminas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da

Universidade Federal de Santa Catarina, em parceria com o Prof. Miguel Pedro Guerra. Para a extração das poliaminas foram utilizadas 0,2 g de massa fresca de folhas proveniente dos tratamentos contendo 0, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de extrato de cada replicata. A análise de poliaminas foi realizada com base no protocolo proposto por SILVEIRA *et al.* (2004) e envolveu etapas de extração de poliaminas livres utilizando ácido perclórico, seguida de dansilação e posterior quantificação por HPLC. As médias dos dados obtidos para a quantificação dos teores de poliaminas foram submetidas a análise de variância e posteriormente submetidas a teste de separação de médias SNK ao nível de significância de 5% (p<0,05).

#### 4.6 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs)

Folhas obtidas de plântulas de *E. secundum* germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Cortes transversais foram realizados na base das folhas, com secções medindo cerca de 5 mm. O meio de cultura utilizado foi o MS/2, contendo 0; 18,75; 37,5; 56,25; 75 e 93,75 mg L<sup>-1</sup> de extrato de *K. alvarezii*.

A unidade experimental consistiu de seis bases foliares por placa de Petri contendo 25 ml (90 mm x 15 mm), sendo utilizadas 10 repetições por tratamento. As placas foram mantidas em sala de crescimento, inicialmente no escuro por um período de 45 dias, sendo depois transferidas para a luz por mais 15 dias.

A porcentagem de explantes que regenerarem ESP's e o número de ESP's formados por explante foram avaliados após 60 dias.

#### 4.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises foram realizadas no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná, em parceria com o Prof. Miguel Daniel Nosedá. O extrato de *K. alvarezii* foi dissolvido em D<sub>2</sub>O (60 mg mL<sup>-1</sup> para <sup>13</sup>C e 20 mg mL<sup>-1</sup> para <sup>1</sup>H RMN), e as análises de RMN foram registradas a 70 °C usando um espectrômetro (Bruker Avance DRX400) equipado com uma sonda de detecção inversa multinuclear de 5 mm. Os desvios químicos foram



expressos em ppm, em relação à acetona (padrão interno) a 30,20 para  $^{13}\text{C}$  e a 2,224 para  $^1\text{H}$ .

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os resultados obtidos foram submetidos a análise de regressão, testando modelo linear ou não-linear, onde se aplicou aquele que melhor se adequasse aos dados de acordo com análise de variância (ANOVA). As análises foram realizadas em ambiente R utilizando a interface gráfica Rstudio, versão 3.3.1.

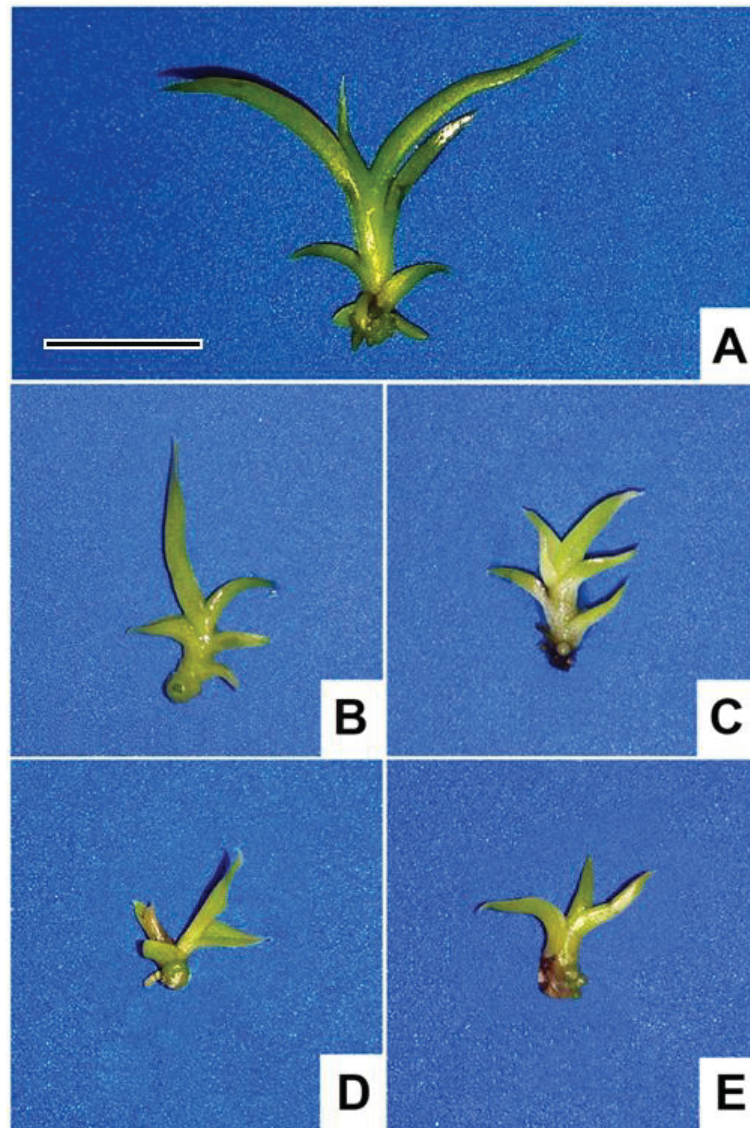
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EFEITO DO EXTRATO *Ulva fasciata* NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS

Após as 12 semanas no cultivo *in vitro*, as plântulas obtidas foram avaliadas conforme os parâmetros citados na metodologia. Observou-se que em todos os tratamentos na presença do extrato de *U. fasciata* houve evidente inibição do desenvolvimento das plântulas de *E. secundum* quando comparadas às plântulas cultivadas no tratamento controle (sem a presença do extrato), conforme Fig 2.

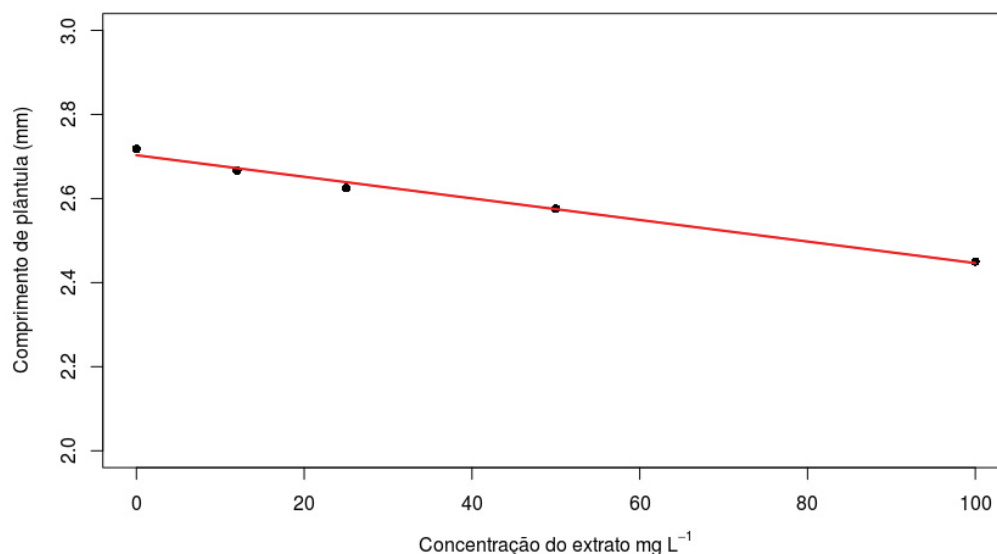
Após 30 dias do início do experimento, todos os tratamentos na presença do extrato de *U. fasciata* apresentavam 100% de oxidação do meio de cultura, enquanto o mesmo não foi observado no tratamento controle. A oxidação do meio de cultura está relacionada com a liberação de compostos fenólicos, em decorrência de estresse sofrido pela planta. A presença de substâncias estressoras no meio de cultura acarreta na exsudação de produtos do metabolismo secundário, e seu acúmulo pode inibir o desenvolvimento vegetal ou mesmo levar a necrose e morte dos tecidos vegetais (AHMAD *et al*, 2013).

Embora a literatura traga relatos da aplicação do extrato de *U. fasciata* como potencial bioestimulante (GESTINARI *et al*, 2002; HAMOUDA, 2012), o maior número de relatos com esse composto se concentra em sua aplicação na indução de resistência em plantas (PAULERT *et al*, 2009) e, segundo Dapper *et al* (2014) representa 40,4% dos estudos realizados com algas marinhas até então. Os mecanismos vegetais de indução de resistência agem justamente reconhecendo determinadas moléculas, causando um estresse na planta, que leva ao aumento na produção e liberação de metabólitos secundários (JONES; DANGL, 2006). Pode-se, então, atribuir a esse efeito elicitor o escurecimento do meio de cultura que foi observado ao se adicionar o extrato de *U. fasciata*.



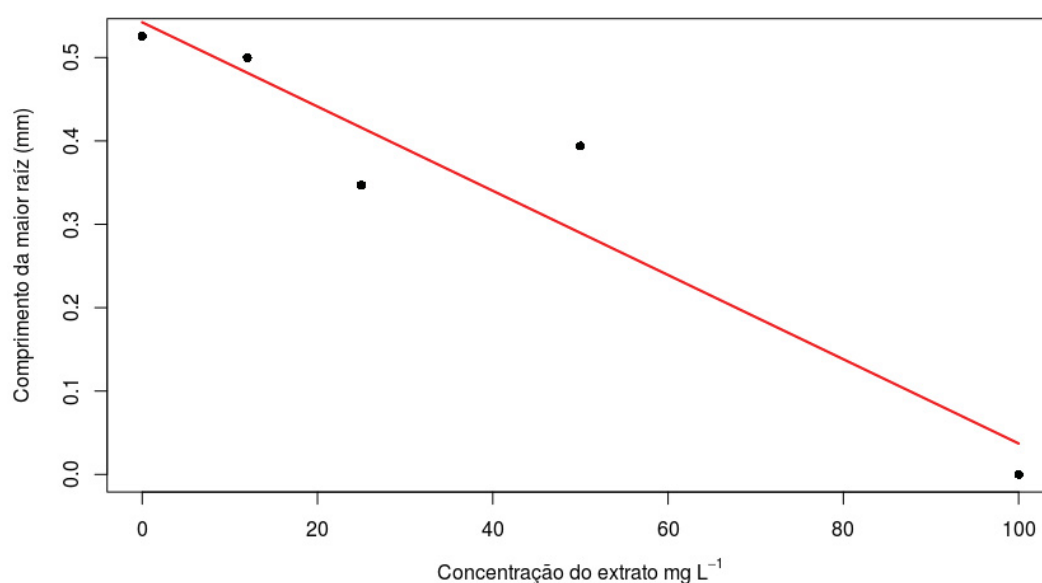
**FIGURA 2.** Características morfológicas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS / 2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Ulva fasciata*. A: controle; B: 12 mg L<sup>-1</sup>; C: 25 mg L<sup>-1</sup>; D: 50 mg L<sup>-1</sup>; E: 100 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 10 mm.

A adição do extrato de *U. fasciata* parece exercer um efeito deletério, inibindo o desenvolvimento das plântulas de *E. secundum*. A medida que aumentava-se a concentração do extrato no meio de cultura observou-se gradual diminuição no tamanho das plântulas, de forma inversamente proporcional (Fig 3).



**FIGURA 3.** Comprimento (mm) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*. Equação da reta:  $y = -0.00256x + 2,7030$ .  $R^2 = 0,9853$ . Valor de p: 0.00049. Coeficiente de variação entre 0 e 181,1.

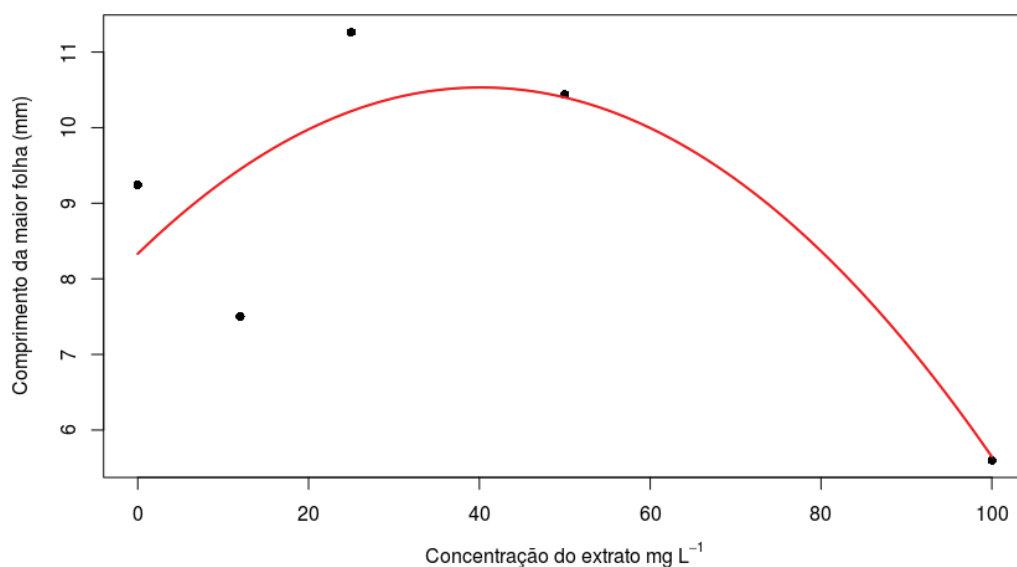
Na presença do extrato, o enraizamento também foi bastante prejudicado, indicando menores taxas de enraizamento também de forma inversamente proporcional a concentração suplementada de extrato. As raízes, quando formadas, eram menores que aquelas formadas no tratamento controle, na ausência do extrato de *U. fasciata*. O aumento da concentração do extrato no meio provocou uma drástica diminuição no desenvolvimento da raiz (Fig 4).



**FIGURA 4.** Comprimento (mm) das raízes de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes

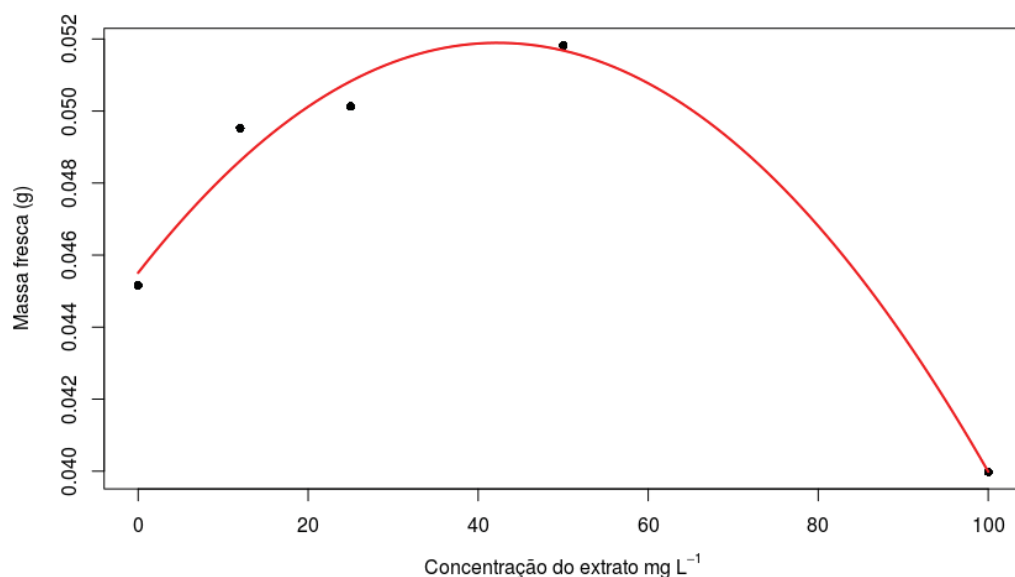
concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*. Equação da reta:  $y = -0.0050x + 0,5422$ .  $R^2 = 0,8681$ . Valor de p: 0.0136. Coeficiente de variação entre 0 e 150,4.

Em relação ao comprimento foliar, foi observado um leve aumento próximo a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> seguido de queda, onde na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> os resultados obtidos no tamanho das folhas eram inferiores à média observada para a mesma variável no tratamento controle, na ausência do extrato (Fig 5).



**FIGURA 5.** Comprimento (mm) das folhas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*. Equação da reta:  $y = -0.00136x^2 + 0.1096x + 8,3315$ .  $R^2 = 0,451$ . Valor de p: 0.2744. Coeficiente de variação entre 14,5 e 40,5.

De modo semelhante ao comportamento observado na variável “comprimento foliar”, o resultado obtido em relação a massa fresca demonstra certo ganho de massa das plântulas concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, com brusca diminuição na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, onde as plântulas tiveram uma massa fresca inferior à média observada para a mesma variável no tratamento controle, na ausência do extrato (Fig. 6).



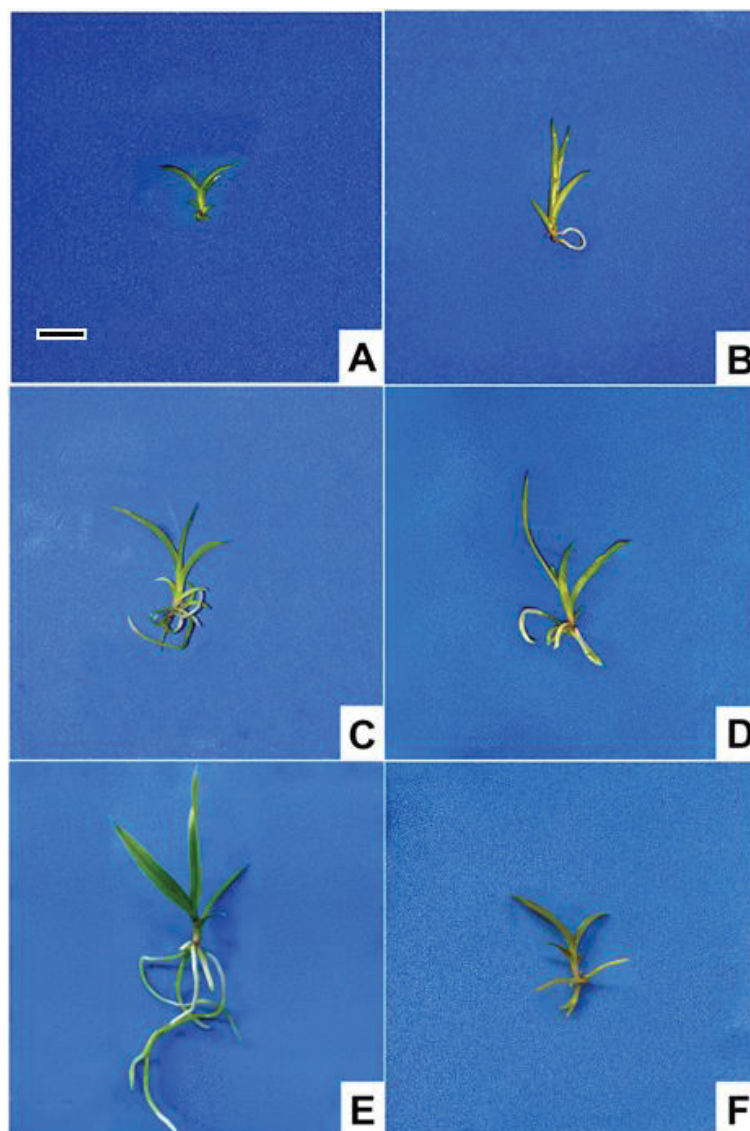
**FIGURA 6.** Massa fresca (g) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Ulva fasciata*. Equação da reta:  $y = -4E-06x^2 + 0,0003x + 0,0455$ .  $R^2 = 0,9683$ . Valor de p: 0.01587. Coeficiente de variação entre 14,9 e 43,1.

Uma vez que o extrato de *U. fasciata* não apresentou resultados positivos na indução do desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *E. secundum*, essas plântulas não foram utilizadas nas análises anatômicas, quantificação de poliaminas, aclimatização e caracterização do extrato.

## 5.2 EFEITO DO EXTRATO *Kappaphycus alvarezii* NO DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

As plântulas apresentaram uma melhora gradual em suas características morfológicas e desenvolvimento em tratamentos variando a concentração do extrato de *K. alvarezii* de 0 mg L<sup>-1</sup> a 50 mg L<sup>-1</sup>. No tratamento com 100 mg L<sup>-1</sup> observou-se diminuição do desenvolvimento quando comparado ao tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup>, apresentando características morfológicas e de desenvolvimento semelhantes ao tratamento controle (Fig. 7).

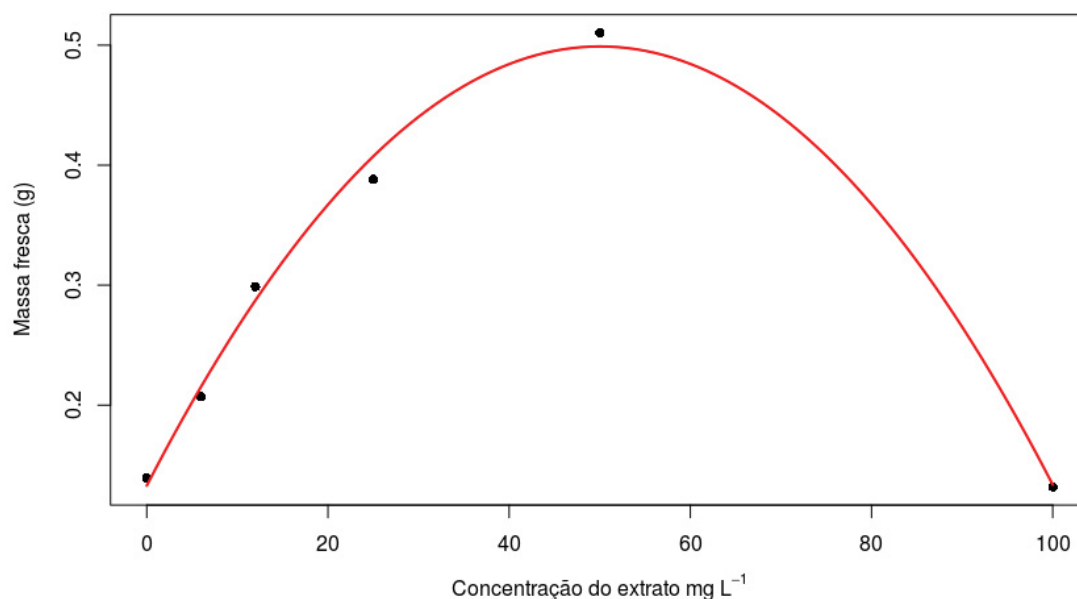




**FIGURA 7.** Características morfológicas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS / 2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*. A: 0 mg L<sup>-1</sup>; B: 6 mg L<sup>-1</sup>; C: 12 mg L<sup>-1</sup>; D: 25 mg L<sup>-1</sup>; E: 50 mg L<sup>-1</sup>; F: 100 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 10 mm.

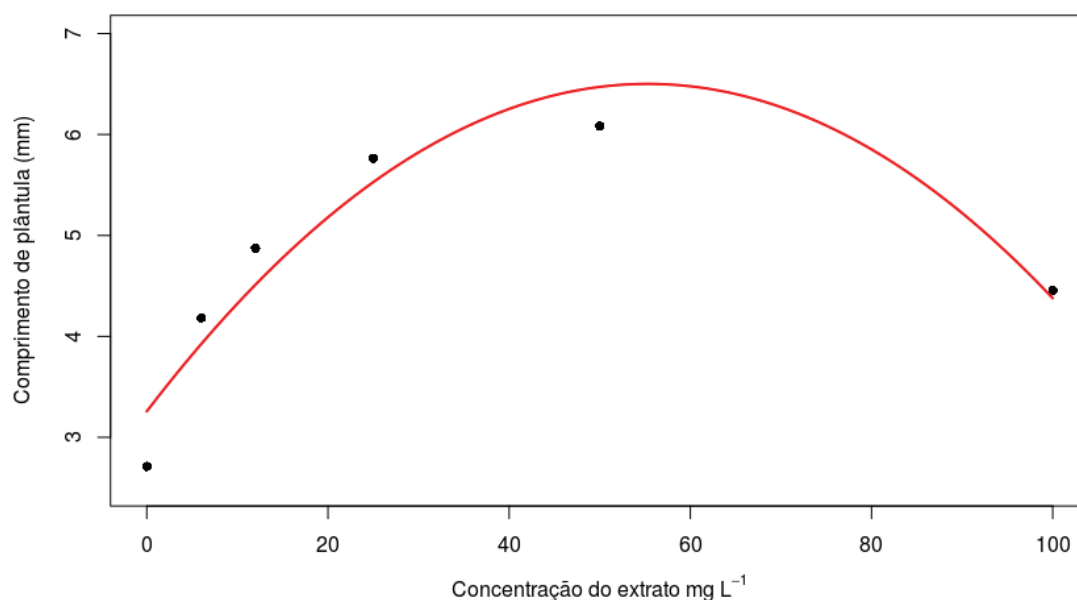
Em geral, o extrato apresentou efeito bioestimulante para todas as variáveis analisadas nos tratamentos suplementados até 50 mg L<sup>-1</sup>, indicando um efeito deletério apenas na maior concentração avaliada.

O tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> indicou as maiores médias de massa fresca, com média de 0,510 g, contra 0,130 g do tratamento controle (Fig. 8).



**FIGURA 8.** Massa fresca (g) analisada de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*. Equação da linha:  $y = -0,00014x^2 + 0,0146x + 0,1329$ .  $R^2 = 0,989$ . valor de  $p = 0,0005$ .

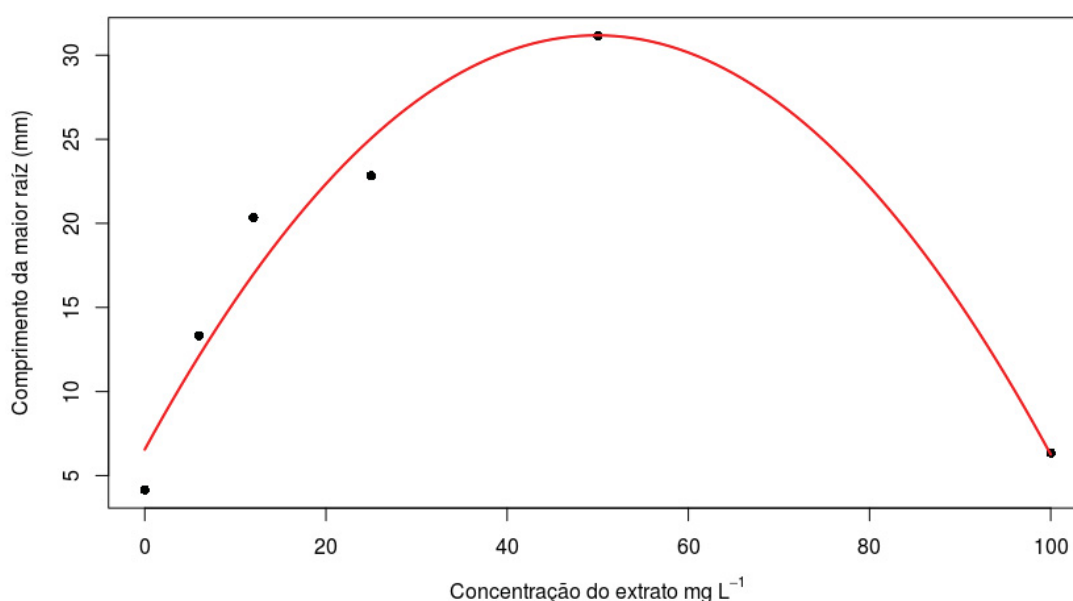
Em relação ao tamanho das plântulas, o melhor tratamento também foi observado com a suplementação de 50 mg L<sup>-1</sup>, com tamanho médio de plântula de 6 mm, comparado aos 2 mm observados no tratamento controle (Fig. 9).



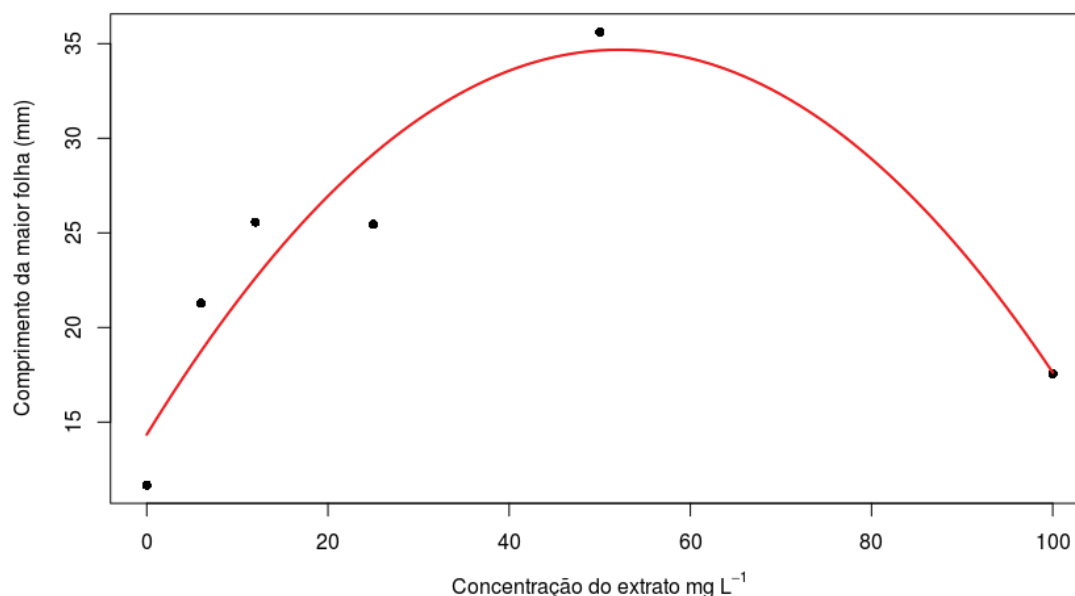
**FIGURA 9.** Comprimento das plântulas analisadas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*. Equação da linha:  $y = -0,001x^2 + 0,1113x + 3,2570$ .  $R^2 = 0,839$ . valor de  $p = 0,0298$ .

Karthikeyan e Shanmugam (2017) também observaram aumento da massa fresca e promoção do crescimento em plantas de cana-de-açúcar com aplicação foliar de extrato de *K. alvarezii*, corroborando nossos resultados.

Assim como nas demais variáveis analisadas, o comprimento das raízes e folhas também apresentou os maiores valores no tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> (Figs 10 e 11, respectivamente). Um aumento no comprimento foi observado na presença do extrato, com um pico no tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup>, seguido de uma diminuição de 100 mg L<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam que o uso do extrato em concentrações específicas é efetivo na estimulação do crescimento de raízes e folhas de *E. secundum*.



**FIGURA 10.** Comprimento da maior raiz (mm) analisadas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*. Equação da linha:  $y = -0,00991x^2 + 0,9880x + 6,5527$ .  $R^2 = 0,927$ . valor de  $p = 0,0091$ .



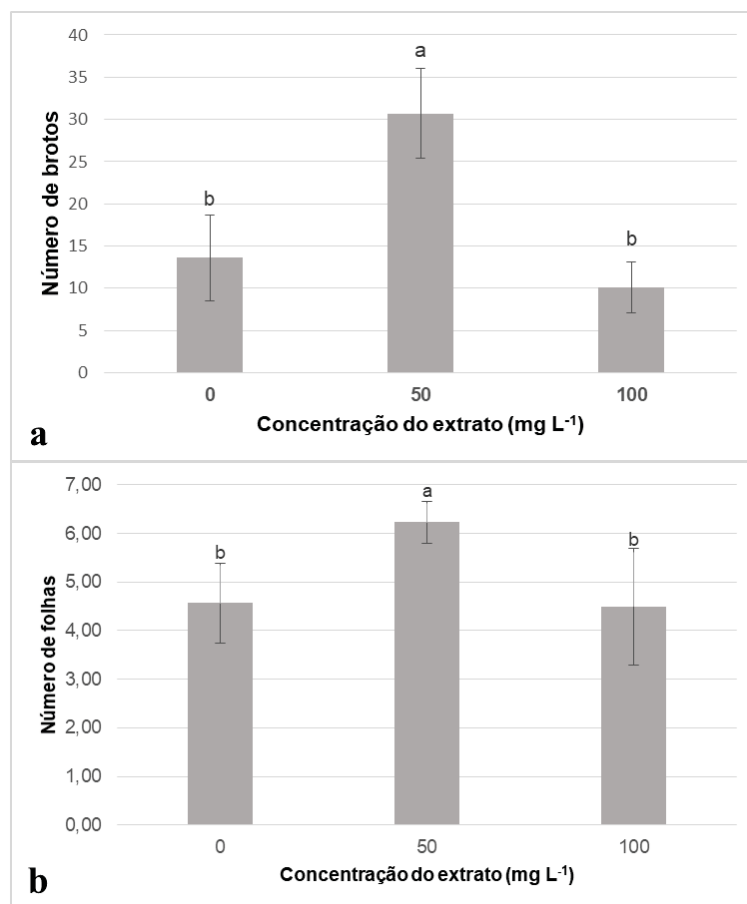
**FIGURA 11.** Comprimento da maior folha analisadas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*. Equação da linha:  $y = -0,0074x^2 + 0,7791x + 14,34$ .  $R^2 = 0,814$ . valor de  $p = 0,0372$ .

Após o estabelecimento da melhor concentração do extrato de *K. alvarezii* para o desenvolvimento das plântulas de *E. secundum*, também foram avaliadas as variáveis número de brotações e folhas, considerando apenas o tratamento controle, o melhor tratamento (50 mg L<sup>-1</sup>), e a maior concentração do extrato testada (100 mg L<sup>-1</sup>).

O uso do extrato de *K. alvarezii* também mostrou efeito estimulante sobre os brotos formados de plântulas inoculadas *in vitro* em concentrações específicas. Um aumento do número de brotos formados foi observado na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, o que indicou melhora significativa na parte aérea dos brotos formados (Fig. 12a). Em contraste, o uso de 100 mg L<sup>-1</sup> mostrou menor número de brotos formados, semelhante ao controle (Fig. 12a).

A formação de brotos adventícios em geral está relacionada à atividade das citocininas. Vários autores relataram altas concentrações de citocininas naturais presentes na composição de extratos de algas marinhas, indicando efeitos biológicos quando usados como bioestimulantes em plantas (BLUNDEN, 1977; CROUCH, VAN STADEN, 1993; TUHY e CHOJNACKA, 2015). Além disso, o uso do extrato de *Kappaphycus alvarezii* mostrou aumentar o conteúdo endógeno de citocininas nas plantas (MONDAL *et al.*, 2015). Em nosso estudo,

não quantificamos citocininas do extrato de *K. alvarezii*; no entanto, devido ao efeito estimulante nos brotos formados, podemos supor a presença destes fitormônios no extrato aquoso suplementado no meio de cultura.



**FIGURA 12.** Número de brotos e folhas de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus alvarezii*. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de separação de médias da SNK (95%).

O número médio de folhas também foi significativamente maior no tratamento contendo 50 mg L<sup>-1</sup> do extrato, ao contrário dos tratamentos 0 e 100 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 12b). Rani e Evanjeline (2015) também observaram aumento no número médio de folhas em amoreira, quando tratadas com o extrato de *K. alvarezii* via aplicação no solo. As folhas estão diretamente relacionadas à atividade fotossintética, e seu aumento contribui substancialmente para o desenvolvimento das plantas, como observado em plantas de milho tratadas com o extrato de *K. alvarezii* (MONDAL *et al.*, 2015).

Outro aspecto interessante observado foi a ausência de oxidação nas plântulas submetidas a tratamentos suplementados com extrato. Essa observação corrobora relatos anteriores do potencial antioxidante natural desse extrato de alga (KUMAR *et al.*, 2008; DIYANA *et al.*, 2015; KANATT *et al.*, 2015). A oxidação, caracterizada pelo escurecimento do meio de cultura, é um problema comum observado em plantas *in vitro*, causado pelo exsudato de polifenóis de tecidos vegetais sob estresse, e seu acúmulo pode resultar em eventual morte do explante (PAN e VAN STADEN, 1998; GEORGE *et al.* 2008). Assim, o uso do extrato de *K. alvarezii* pode melhorar as condições de cultivo reduzindo a oxidação e promovendo a obtenção de plântulas mais saudáveis de *E. secundum*.

### 5.3 EFEITOS DO EXTRATO DE *K. alvarezii* NA ANATOMIA DE RAÍZES E FOLHAS

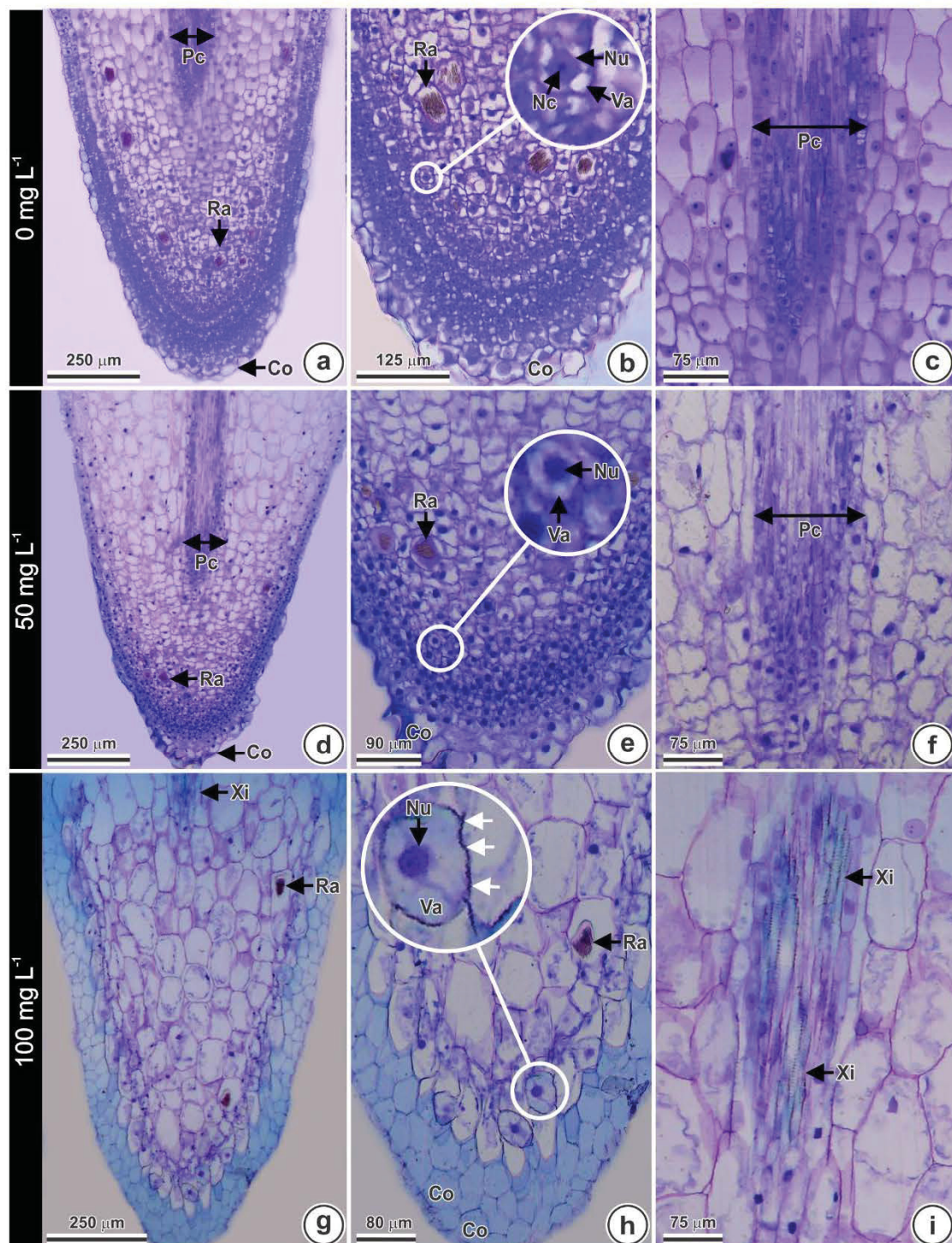
As células do promeristema mostraram características meristemáticas típicas (Fig. 13a e 13b), tais como células (em detalhe) com um núcleo grande (Nu), nucléolo evidente (Nc) e inúmeros vacúolos pequenos (Va), além de parede celular delgada. Também pudemos observar a presença de idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio (Ra), que demonstram células diferenciadas entre as células que compõem o meristema fundamental. Na região do procâmbio (Pc), não pudemos observar células com parede secundária espessada (Fig. 13c).

Embora morfológicamente diferentes do controle, os ápices radiculares das plântulas submetidas ao tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 13d) não diferiram anatomicamente das do tratamento controle. Esses ápices compartilhavam as mesmas características descritas acima, como a presença de ráfides, coifa e um meristema composto de células pequenas e densas (Fig 13e) e um procâmbio bem estruturado (Fig. 13f).

No tratamento com 100 mg L<sup>-1</sup>, apenas poucas células indicaram características meristemáticas. Na Fig. 13h, em detalhe, observa-se que os núcleos são menores, comparados ao tamanho da célula. Existem numerosos vacúolos, e essas células indicaram um menor aspecto de diferenciação, em contraste com uma presença de parede celular mais espessada, que não é



característica de células indiferenciadas. Na região do procâmbio (Fig. 13i), as células apresentaram um grau aumentado de diferenciação, podendo até ser consideradas células do xilema (Xi), uma vez que as paredes celulares apresentam espessamento evidente.

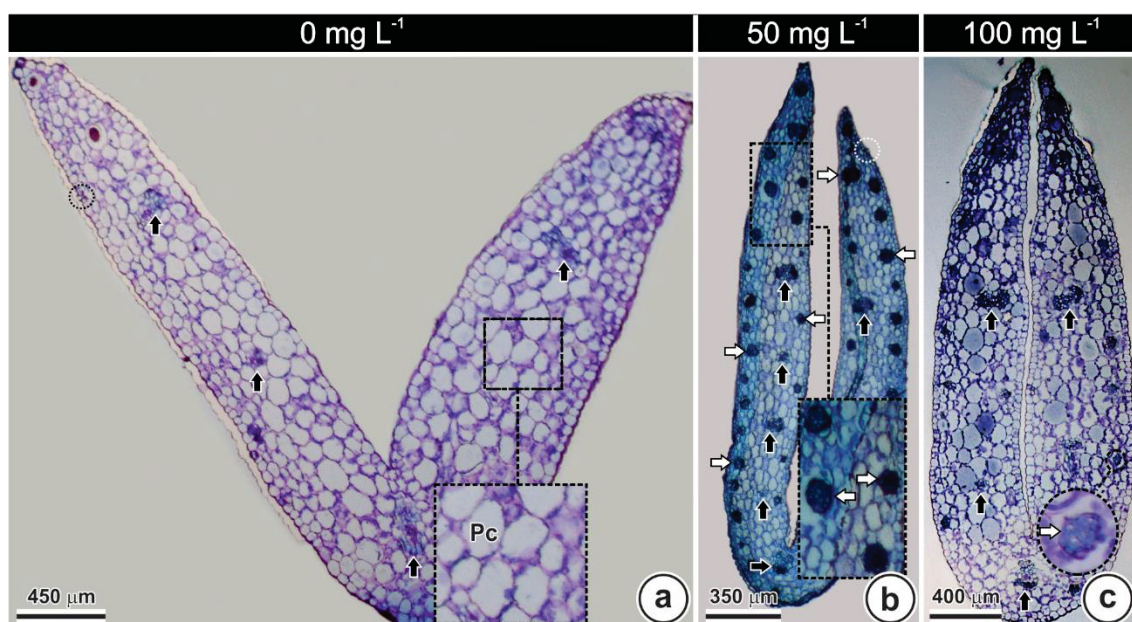


**FIGURA 13.** Anatomia da raiz de *Epidendrum secundum* (cortes longitudinais em microscopia de luz). a-c: tratamento com 0 mg L<sup>-1</sup>. d-f: tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup>. g-i: tratamento com 100 mg L<sup>-1</sup>. a: rafides (Ra) na região meristema fundamental. b: células com nucléolo evidente (Nu) e núcleos grandes (Nc). c:



procâmbio (Pc). d: Coifa (Co) com células vacuolizadas. e: células contendo vários vacúolos (Va). f: procâmbio. g: mais células vacuolizadas com rafides e a presença de xilema (Xi). h: células contendo paredes celulares mais espessas (setas brancas) e grandes vacúolos. i: células de protoxilema, com aspecto mais diferenciado do que o observado nos demais tratamentos.

Diferentemente dos ápices radiculares, a anatomia foliar mostra que o tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> (Fig 14b) diferiu tanto dos tratamentos controle (Fig 13a) quanto do 100 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 14c). A lâmina foliar obtida de plântulas submetidas ao tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> indicou um mesofilo bem diferenciado com células compactas e bem organizadas. Os outros dois tratamentos avaliados indicaram uma região mesofílica composta por células grandes e mal organizadas; embora, observamos uma epiderme bem organizada.



**FIGURA 14.** Anatomia foliar de *Epidendrum secundum* (cortes longitudinais em microscopia de luz). a - 0 mg L<sup>-1</sup> de tratamento. b: tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup>. c: tratamento com 100 mg L<sup>-1</sup>. Setas pretas: feixes vasculares; Setas brancas: feixes de fibras.

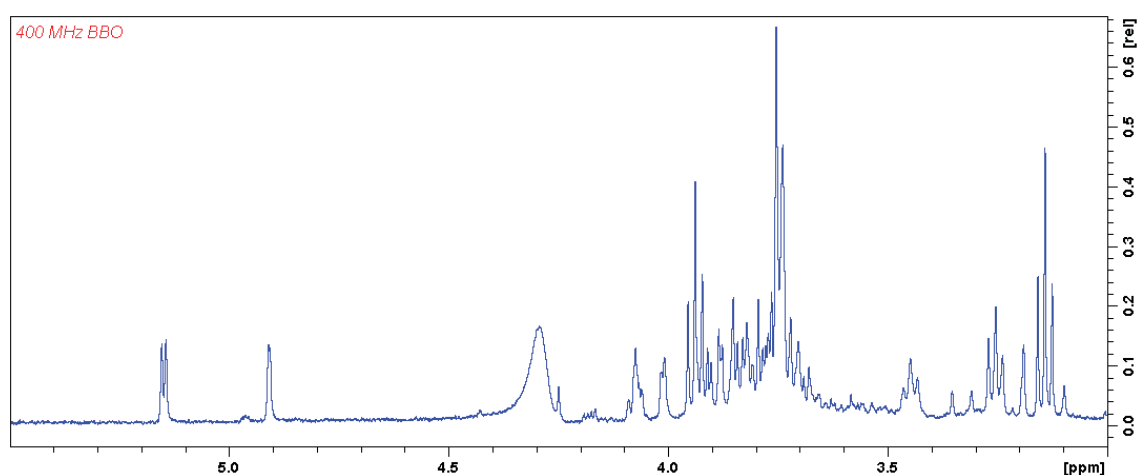
Além disso, também observamos, no tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup>, a presença de inúmeros feixes de fibras na região subepidérmica, não associados a feixes vasculares. A presença de feixes de fibras na região da folha é uma característica comum em plantas desta espécie (OLIVEIRA e SAJO, 1999b), sendo considerada como uma estratégia anatômica de adaptação ao estresse hídrico (THANGAVELU e MUTHU, 2017). Segundo Silva *et al.* (2006), a função desses feixes de fibras é melhorar a resistência mecânica à lâmina foliar,

evitando a degradação foliar durante o estresse hídrico. Assim, as plântulas deste tratamento parecem estar melhor adaptadas às condições *ex vitro*.

As seções foliares de plântulas do tratamento controle (Fig. 14a) mostram características típicas da hiperidricidade, como tecidos menos diferenciados, poucos feixes de fibras, células grandes, espaços intercelulares melhorados e aspecto menos lignificado (GEORGE *et al.* 2008). Essa anormalidade é comumente relatada em plantas micropropagadas e é um dos fatores responsáveis pelas baixas taxas de sobrevivência das plantas após o processo de aclimatização (PALMA *et al.*, 2011). Todas essas características de hiperidricidade não foram observadas nos tratamentos suplementados com extrato, o que poderia ser um indicador de diminuição do processo de hiperidricidade, consequentemente aumentando o potencial de sobrevivência dessas plântulas, especialmente aquelas do tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup>.

#### 5.4 ESPECTROSCOPIA DE RMN DO EXTRATO DE *K. alvarezii*

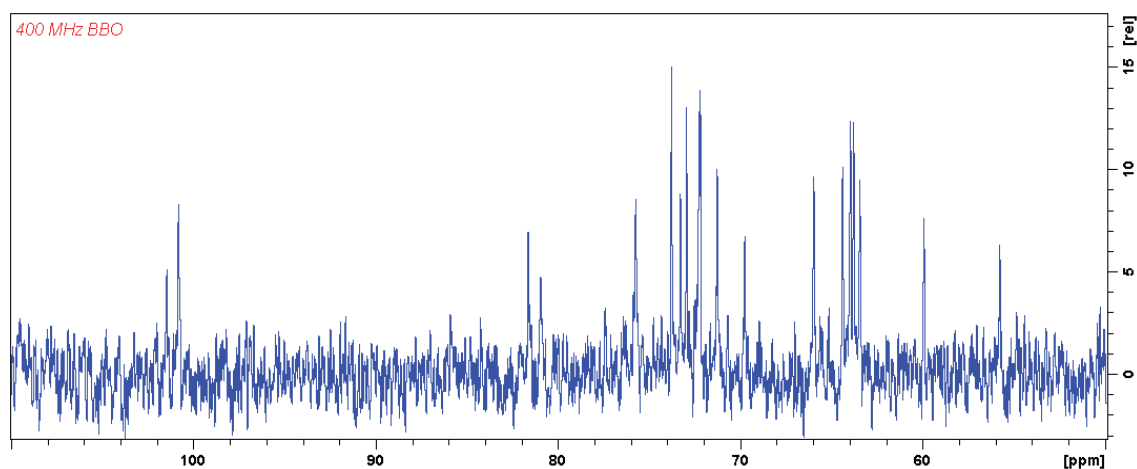
Análises por RMN do extrato mostraram que os principais sinais correspondem aos carboidratos. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 15), mostra os principais sinais entre 3,0 e 5,5 ppm. Análises de RMN anteriores de extratos de outras algas vermelhas indicaram picos semelhantes, que foram atribuídos a glicosídeos (SIMON-COLIN *et al.* 2002a; ASCÊNCIO *et al.* 2006).



**FIGURA 15.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato aquoso obtido da alga marinha vermelha *Kappaphycus alvarezii*.

As macroalgas vermelhas produzem vários açúcares, como manose, galactose e glicose, e os dois primeiros são comumente associados a glicerol e derivados, formando glicosídeos também conhecidos como heterosídeos (YOON *et al.*, 2010; HAGEMANN e PADE 2015; YUN *et al.* 2016). O espectro de  $^1\text{H}$  do extrato mostra dois sinais na região anomérica de 5,15 e 4,88 ppm que foram atribuídos ao H-1 de floridosídeo ( $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-glicerol) e digeneasídeo ( $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$  2)-D-glicerato), respectivamente, de acordo com relatórios anteriores (SIMON-COLIN *et al.* 2002a; ASCÊNCIO *et al.* 2006). Ambos os compostos são abundantes em algas vermelhas e são descritos como o principal produto fotossintético e atuam como osmorreguladores intracelulares (HAGEMANN e PADE 2015).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 16) mostra apenas dois sinais na região anomérica a 97,8 e 98,5 ppm que foram atribuídos a C-1 das porções de açúcar de floridosídeo e digeneasídeo. Os resultados de RMN indicam que esses glicosídeos são os principais componentes presentes no extrato de *K. alvarezii*.



**FIGURA 16.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato aquoso obtido da alga marinha vermelha *Kappaphycus alvarezii*.

Além disso, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , é possível observar picos abaixo de 60 ppm, uma região do espectro que não corresponde a carboidratos. Este resultado indica a presença de uma terceira molécula orgânica no extrato, além dos glicosídeos floridosídeo e digeneasídeo. Picos de RMN semelhantes foram observados em extratos de algas vermelhas, entre 52 e 57 ppm, e foram atribuídos ao ácido isotiônico (ácido 2-hidroxietanossulfônico) (SIMON-COLIN *et*

*al.*, 2002b). Até onde sabemos, não há relatos sobre os efeitos biológicos deste composto nas plantas (BARROW *et al.* 1993). É relatado que o ácido isotiônico pode formar complexos com digeneasídeo e floridosídeo, cuja função ainda é discutida, embora pareça haver indícios de atividade anti-nutricional desses complexos, atuando como aleloquímicos (SIMON-COLIN *et al.* 2002b; HELLIO *et al.* 2004).

## 5.5 SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS À ACLIMATIZAÇÃO

Após três meses de aclimatização em casa de vegetação, as plântulas provenientes do tratamento controle apresentaram 50% de sobrevivência, não diferindo na taxa de sobrevivência observada entre as plântulas provenientes do tratamento contendo 6 mg L<sup>-1</sup> de extrato. Os melhores resultados de aclimatização ocorreram entre as plântulas propagadas com concentrações mais elevadas do extrato, com uma média de 64 a 85% de sobrevivência nos tratamentos entre 12 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1). Tal resultado pode indicar que o uso do extrato na propagação *in vitro* pode promover a sobrevivência de plântulas posteriormente transferidas para a condição *ex vitro*.

**TABELA 1.** Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Epidendrum secundum* provenientes de diferentes tratamentos com extratos de *K. alvarezii* durante a aclimatização.

Tratamento	Sobrevivência (%)		
	30 dias	60 dias	90 dias
0	78	64	50
6	92	64	50
12	78	71	64
25	100	78	64
50	92	78	64
100	100	85	85

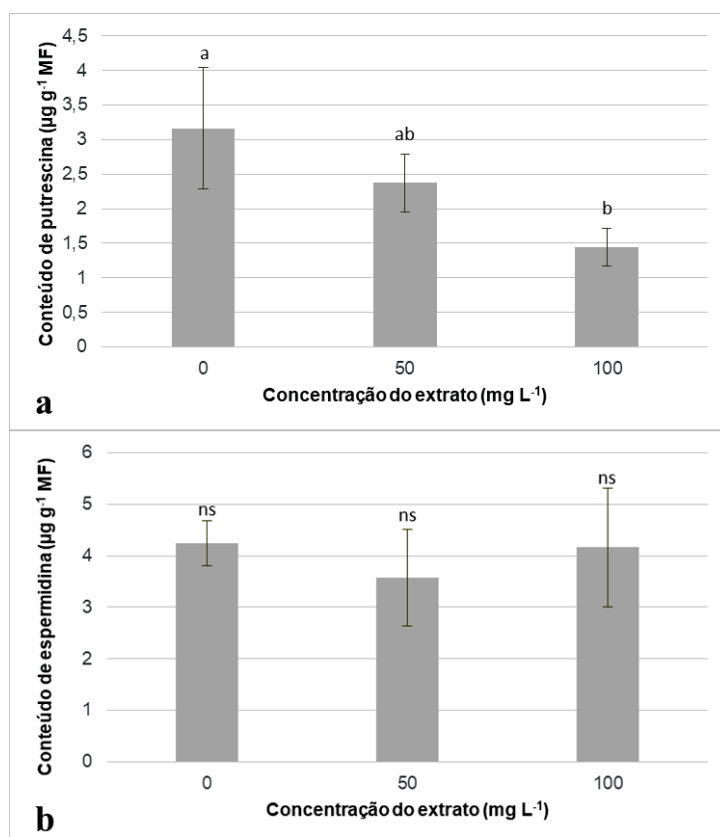
A aclimatização de espécies do gênero *Epidendrum* tem sido descrita na literatura. A porcentagem de sobrevivência obtida pode ser considerada boa, considerando que os valores são bastante próximos ao que foi descrito na

literatura durante a aclimatização de *E. secundum* e *E. ibaguense*, com taxas de sobrevivência entre 70 e 100% (MENEZES, OLIVEIRA e FARIA, 2004; TEIXEIRA DA SILVA, GIANG e TANAKA, 2005; HOSSAIN, 2008; FERREIRA, SMIDT e RIBAS, 2015).

## 5.6 QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS

Nas análises por HPLC do tecido vegetal foram identificadas as poliaminas putrescina e espermidina. As poliaminas cadaverina e espermina não foram identificadas em quantidades detectáveis.

Os níveis de espermidina não indicaram alteração nos níveis endógenos no tecido vegetal, independente do tratamento aplicado (Fig 17b). Houve, contudo, uma redução nos níveis médios de putrescina a medida que ocorreu o aumento na concentração do extrato (Fig 17a).



**FIGURA 17.** Conteúdo endógeno de putrescina (a) e espermidina (b) de plântulas de *Epidendrum secundum* após 90 dias de cultivo em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações do extrato de *Kappaphycus*

*alvarezii*. Letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de separação de médias da SNK (95%). ns: não significativo.

Conforme ocorre o aumento da concentração do extrato, menor o conteúdo de putrescina livre, o que pode indicar que o extrato está inibindo sua biossíntese ou, então, desviando a poliamina ou seus precursores para outra rota metabólica. Embora a putrescina esteja relacionada com o desenvolvimento vegetal através da proliferação celular, compartilha da S-adenosilmetionina (SAM) como precursor na biossíntese do etileno, desempenhando papel na regulação da senescência vegetal (BAIS, RAVISHANKAR, 2002). O que serve de hipótese para aspecto de envelhecido observado no tecido vegetal em concentrações maiores do extrato.

Os níveis mais baixos de putrescina nos tecidos mais diferenciados podem ser um indicativo de que a SAM está sendo utilizada na síntese do hormônio de senescência. Por outro lado, a redução nos níveis dessa poliamina pode ser não causa, mas efeito, já que a diminuição nos níveis de poliaminas é naturalmente esperado em tecidos mais diferenciados, enquanto a ocorrência dessa molécula é maior em tecidos juvenis (GALSTON, SAWHNEY, 1990).

## 5.6 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs)

Após 45 no escuro, ocorreu a formação de ESPs em diferentes tratamentos (Tabela 2), sendo os primeiros observados aos 30 dias do experimento.

Não observou-se a formação de ESPs nos tratamentos controle e contendo 93,75 mg L<sup>-1</sup> de extrato. Concentrações intermediárias do extrato parecem ter estimulado a formação dessas estruturas nas bases foliares, sendo o tratamento contendo 18,75 mg L<sup>-1</sup> aquele em que o maior número de bases respondeu ao tratamento, totalizando um número de 21 novas estruturas.

Com a transferência para a luz, as ESPs se tornaram clorofiladas em cerca de 3 dias. Ao final dos 15 dias, todas as ESPs tinham se convertido em plântulas completas, com folhas e radículas.

**TABELA 2.** Porcentagem de explantes que responderam aos tratamentos e número de novos brotos de *Epidendrum secundum*, a partir de bases foliares.

Tratamento (mg L <sup>-1</sup> )	Explantes que formaram ESPs (%)	Nº total de ESPs formadas
0	0	0
18,75	8,3	21
37,5	3,3	3
56,25	1,6	3
75	1,6	1
93,75	0	0

Os resultados obtidos nesse experimento, embora bastante preliminares, revelam potencial do extrato de *K. alvarezii* na indução da formação de ESPs de forma completamente independente da adição de reguladores vegetais, diferindo dos protocolos até então propostos para a espécie (FERREIRA, SMIDT e RIBAS, 2015). Neste sentido, novos experimentos poderão ser implementados com o uso do extrato visando melhor caracterizar esse processo em *E. secundum*.



## 6. CONCLUSÃO

Embora a adição do extrato de *U. fasciata* pareça ter agido como agente elicitor, exercendo efeito deletério sobre o desenvolvimento in vitro das plântulas de *E. secundum*, o extrato aquoso de *K. alvarezii* demonstrou efeito extremamente positivo, estimulando o enraizamento, desenvolvimento de plântulas, ganho de peso fresco e brotações formadas de plântulas de *E. secundum*, principalmente na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, o extrato pareceu exercer influência sobre os níveis de poliaminas, estimulou a formação de estruturas semelhantes a protocormos a partir de bases foliares e melhorou as taxas de sobrevivência durante a aclimatização.

Com base nos resultados obtidos, o uso do extrato de *K. alvarezii* indica potencial aplicação na cultura de tecidos e produção de plantas, devido ao seu efeito bioestimulante vegetal.

### 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando a grande demanda de mercado por novas tecnologias e o crescente interesse na aplicação de recursos marinhos, o presente trabalho apresenta dados relevantes sobre o potencial bioestimulante deste extrato, que pode ser aplicado com sucesso para o cultivo de outras espécies de orquídeas e espécies de interesse ecológico e econômico.

Faz-se importante a implementação de novos experimentos avaliando os possíveis efeitos do extrato de *K. alvarezii* na ultraestrutura celular, assim como verificar a cinética enzimática antioxidante no material vegetal. Tais análises ajudarão a compreender melhor alguns dos resultados até aqui observados.

## 7. REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; HUSSIAN, T.; ASHRAF, I.; NEFEES, M.; MARAYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. (2013) Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* v. 13, n. 4, p. 539-547.

ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytology*, v. 145, p. 367-421.

ASCÊNCIO, S.D.; ORSATO, A.; FRANÇA, R.A.; DUARTE, M.E.; NOSEDA, M.D. (2006) Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignment of digeneaside, a low-molecular-mass carbohydrate produced by red seaweeds. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 677-682.

BAIS, H.P.; RAVISHANKAR, G.A. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 69, p. 1-34.

BARROW, K. D.; KARSTEN, U.; KING, R. J. (1993) Isothionic acid from the marine red alga *Ceramium flaccidum*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 34, p. 1429-1430.

BLUNDEN, G. (1977) Cytokinin activity of seaweed extracts. In: Faulkner DJ, Fenical WH (eds) Marine natural products chemistry. *Plenum*, New York, p. 337-344.

BRASIL. Ministério do meio ambiente (2014) Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade. Lista nacional oficial de espécies da fauna ameaçadas de extinção. *Diário Oficial da União*. v. 245, p. 121-126.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I.U. (2009) Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, v. 122, p. 507-520.

CROUCH, I.J.; VAN STADEN, J. (1993) Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulation*. v. 13, p. 21-29.

DAPPER, T.B., PUJARRA, S., OLIVEIRA, A.J., OLIVEIRA, F.G.O., PAULERT, R. (2014). Potencialidades das macroalgas marinhas na agricultura: revisão. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v. 7, nº 2, p. 295- 313.

DIYANA, A.F.; ABDULLAH, A.; HISHAM, Z.A.S.; CHAN, K.M. (2015) Antioxidant activity of red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum*. *International Food Research Journal*, v. 22, p. 1977-1984.

DRESSLER, R.L. (2005). How many orchid species? *Selbyana*, v. 26, p. 155-158.

FERREIRA, D.L.; SMIDT, E.C.; RIBAS, L.L.F. (2015) Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. from leaves and protocorms. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 13, p. 1122-1128.

GALSTON, A.W.; SAWHNEY, R.K. (1990) Polyamines in Plant Physiology. **Plant Physiology**, v. 94, p. 406-410.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D. (2008) Plant propagation by tissue culture. The Background. **Springer**, v.1, 3 ed., p. 501.

GESTINARI, L. M. S.; HENRIQUES, A. B.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. (2002) Utilização da farinha seca de *Ulva* spp. e *Sargassum* spp. como bioestimulantes de crescimento na olericultura. **Leandra**, v. 17, p. 45-70.

GOEL, M. K., KUKREJA, A.K., SINGH, A.K.; KHANUJA, S.P.S (2007). In vitro plant growth promoting activity of phyllocladane diterpenoids isolated from *Callicarpa macrophylla* Vahl. In shoot cultures of *Rauwolfia serpentina*. **Nat Prod Commun**. v. 2, p. 799-802.

HAGEMANN, M.; PADE, N. (2015) Heterosides – compatible solutes occurring in prokaryotic and eukaryotic phototrophs. **Plant Biology**, v. 17, p. 927-934.

HAMOUDA, R. (2012). Bioactivity of *Ulva* spp. soluble polysaccharides on germination and growth of some crop plants. **Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology**. v. 3, n. 11, p. 1203-1209.

HELLIO, C.; SIMON-COLIN, C.; CLARE, A.S.; DESLANDES, E. (2004) Isethionic Acid and Floridoside Isolated from the Red Alga, *Grateloupia turuturu*, Inhibit Settlement of *Balanus amphitrite* Cyprid Larvae. **Biofouling**. v. 20, p. 139-145.

HOSSAIN, M.M. (2008) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 3614-3619.

JOHANSEN, B.; RASMUSSEN, H. (1992) *Ex situ* conservations of orchids. **Opera Botanica**. v. 113, p. 43-48.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. (2006) The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329.

KANATT, S.R.; LAHARE, P.; CHAWLA, S.P.; SHARMA, A. (2015) *Kappaphycus alvarezii*: its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. **J Microbiol Biotech Food Sci**, v. 5, p. 1-6.

KARTHIKEYAN, K.; SHANMUGAM, M. (2017). The effect of potassium-rich biostimulant from seaweed *Kappaphycus alvarezii* on yield and quality of cane and cane juice of sugarcane var. Co 86032 under plantation and ratoon crops. **Journal of Applied Phycology**. v. 29, p. 3245-3252.

KUMAR, K.S., GANESAN, K., RAO, P.V.S (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. **Food Chem.** v. 107, p. 289-95.

KUMAR, K., RAO, I.U. (2012). Morphophysiological Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in - *Ex Vitro* Conditions - A Reviews. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants.** v. 2, n. 4, p. 271-283.

LO, S.F., NALAWADE, S.M., KUO CHEN, C.L., TSAY, H.S (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plantlets of *Dendrobium tosaense* Makino—a medicinally important orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.** v. 40, p. 528-535.

MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; LEAL, T.S.; MORAES, C.P (2012). Avaliação do desenvolvimento in vitro de *Epidendrum secundum* Jacq. em meios de cultivo simplificados. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 5, n. 2, p. 337-351.

MENEGUCE, B.; OLIVEIRA, R.B.D.; FARIA, R.T. (2004) Vegetative propagation of *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) in alternative to “xaxim” substrates. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 101-106.

MONDAL, D.; GHOSH, A.; PRASAD, K.; SINGH, S.; BHATT, N.; ZODAPE, S.T.; CHAUDHARY, J.P.; CHAUDHARI, J.; CHATTERJEE, P.B.; SETH, A.; GHOSH, P.K. (2015) Elimination of gibberellin from *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap foliar spray enhances corn stover production without compromising the grain yield advantage. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 657-666.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, p. 473-497.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, p. 367-373.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, M.G. (1999a). Root anatomy of nine orchidaceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 4.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, M.G. (1999b). Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 365-374.

PALMA, D.; SCHUELTER, A.R.; STEFANELLO, S.; FORTES, A.M.T. (2011) Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Rev Bras Agrociência**, v. 1, p. 174-184.

PAN, M.J.; VAN STADEN, J. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155-163.

- PAULERT, R.; TALAMINI, V.; CASSOLATO, J.E.F.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; SMANIA JR, A.; STADNIK, M.J. (2009) Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from Green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263-270.
- PINHEIRO, F., BARROS, F. (2007) Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany**, v. 25, p. 129- 136.
- RANI, S.M.V.; EVANJALINE, M. (2015) Effect of *Kappaphycus alvarezii* SLF on Growth and Biochemicals in *Morus Alba* L. and *Bombyx Mori* L. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, v. 3, p. 47-52.
- RATHORE, S. (2009). Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 351-355.
- RENGASAMY, K. R. R., KULKARNI, M. G., STIRK, W. A., AND VAN STADEN, J. (2015). Eckol - a new plant growth stimulant from the brown seaweed *Ecklonia maxima*. **J. Applied Phycology**, v. 27, p. 581-587.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. (2009). The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 114-1153.
- SANTOS, V.M. Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de *Zea mays*, **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.3, p. 307-318, 2013.
- SILVA, I. V.; MEIRA, R. M.S.A.; AZEVEDO, A.A.; EUCLYDES, R.M.A. (2006) Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB): MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 741-750.
- SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. (2004), Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249.
- SIMON-COLIN, C.; KERVAREC, N.; PICHON, R.; DESLANDES, E. (2002a) Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectral assignment of floridoside. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 279-280.
- SIMON-COLIN, C.; KERVAREC, N.; PICHON, R.; DESLANDES, E. (2002b) Characterization of N-methyl-L-methionine sulfoxide and isethionic acid from the red alga *Grateloupia doryphora*. **Phycological Research**, v. 50, p. 125-128.

SOUZA, M.F., PEREIRA, E.O., MARTINS, M.Q., COELHO, R.I., JUNIOR, O.S.P (2012). Efeito do extrato de *Cyperus rotundus* na rizogênese. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 157-162.

STANCIK, J. F., GOLDENBERG, R., BARROS, F. (2009) O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 864-880.

SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, v. 104, p. 543-556.

TALAMINI, V.; PAULERT, R.; STADNIK, M. (2009) Bioestimulantes e protetores de plantas derivados de algas marinhas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente. São Paulo, p. 129-138.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A. (2003) Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **Afr J Biotechnol**. v. 2, p. 683-691.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; DOBRÁNSZKI, J.; ROSS, S. (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 49, p. 1-16.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; GIANG, D.T.T.; TANAKA, M. (2005) Effective Acclimatization of *Epidendrum in vitro* Using a Novel Micropropagation Vessel. **Biotechnology**, v. 4, p. 214-220.

THANGAVELU, M.; MUTHU, S. (2017) Vegetative anatomical adaptations of *Epidendrum radicans* (Epidendroideae, Orchidaceae) to epiphytic conditions of growth. **Modern Phytomorphology**, v. 11, p. 117-130.

THE PLANT LIST (2013) <http://www.theplantlist.org/>

TUHY, L., CHOJNACKA, K. (2015). Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. **Open Chemistry**, vol. 13, n. 1, p. 1183-1195.

YOON, J.J.; KIM, Y.J.; KIM, S.H.; RYU, H.J.; CHOI, J.Y.; KIM, G.S.; SHIN, M.K. (2010) Production of polysaccharides and corresponding sugars from red seaweed. **Advanced Materials Research**, v. 93, p. 463-466.

YUN, E.J.; KIM, H.T.; CHO, K.M.; YU, S.; KIM, S.; CHO, I.; KIM, K.H. (2016) Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 311-318.